

麝香의 水溶性분이 생쥐 腹腔內 巨食細胞의 活性에 미치는 影響

林 錫 麟

大田大學校 韓醫科大學

Effects of the water soluble fraction of the musk on the activities of murine peritoneal macrophages

Seok-Rhin Lim

College of Oriental Medicine, Daejeon University

The musk has been reported to have significant anti-inflammatory activities in clinical use and several animal models and we examined the effects of water soluble fraction(WSF) of the musk on murine peritoneal macrophages. WSF decreased the production of nitric oxide from the lipopolysaccharide(LPS)-treated murine peritoneal macrophages and also reduced the phagocytic activity of macrophages on the opsonized sheep red blood cells(SRBC). Transcriptional expression level of the inducible nitric oxide synthase(iNOS) was also decreased and the viability of the treated macrophages was not affected by WSF, suggesting that the effects could be partly explained by transcriptional regulation. Contrary to down-regulating iNOS expression, WSF slightly increased the release of tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), which implied its selective action on cellular pathways activated by LPS. Our results showed that anti-inflammatory activities of the musk could be partly explained by the inhibitory effects of the water soluble fraction on the macrophageal activation.

Key words: musk, peritoneal macrophages, anti-inflammatory activities, iNOS

서론

麝香은 사향노루(*Moschus moschiferus* Linne) 수컷의 腺囊에서 분비되는 香液의 건조물로서 神農本草經의 上品에 收載되어 있으며 고대로부터 귀중한 약재로 사용되어 왔다. 임상적으로는 強心, 鎮定, 鎮驚, 血壓降下, 呼吸興奮 등을 통해 腦卒中, 高熱로 인한 의식혼미상태에 사용하며, 瘀血을 消散하고 痛症을 멎게 하는 效能이 있어 婦女經閉, 打撲傷, 慢性炎症

등에 다양하게 활용하고 있다¹⁾. 약리학적인 연구를 통하여서는 強心作用 및 中樞興奮作用, 血壓降下作用과 β -수용체에 대한 카테콜아민(catecholamine)의 흥분 증가²⁾, 남성호르몬 작용, 혈소판 응집억제 작용, 항히스타민작용³⁾, 백혈구 유주시험 억제 작용⁴⁾ 등의 다양한 연구 결과가 보고되어 임상적인 효능을 뒷받침하고 있다.

그러나 1973년 시작된 CITES(Convention on International Trade in Endangered

Species of wild fauna and flora)협약에 1990년대에 우리나라가 가입하게 되면서 사향이 포함된 처방들(牛黃清心元, 麝香蘇合元, 供辰丹, 기용환 등)의 생산과 사용이 난항을 겪게 되자 사향을 대체하고자 하는 많은 연구들이 진행되었고 제약업계에서는 L-muscone, 靈貓香, 石菖蒲 및 樟腦 등의 대체물질들을 사용하기 시작하였다. 이러한 대체물질들을 사용하기 위해서는 麝香의 성분분석과 함께 다양한 약리활성에 대한 기작의 연구가 선결되어야 한다⁵⁾. 기존의 麝香에 대한 연구는 지용성분의 성분분석과 그 생리적 효과에 대한 것이 대부분이었으나^{6),7)} 최근의 연구결과에 의하면 사향의 수용성분이 한천(agar), 과두유(croton oil), 효모(yeast) 등으로 유도한 동물의 염증모델에서 확실한 소염작용을 나타낸다는 것이 밝혀지면서 수용성분에 대한 연구가 부각되고 있다⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 麝香의 수용성분이 나타내는 소염작용을 세포적 및 분자적인 관점에서 규명하기 위하여 생쥐 腹腔内の 巨食細胞의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험동물은 생명공학연구소에서 분양받은 8주령의 C57 b/6 생쥐 암컷을 사용하였으며 분양후 본 실험동물실에서 1주일동안 적응하도록 하였고 명암이 12시간 간격으로 조절되는 실험동물실에서 고형사료와 물을 제한없이 공급하였다.

2. 시료의 조제

본 실험실에서 보관중인 중국 혹은 몽고산의 사향을 증류수에 녹여 교반하고 원심분리하여 불용성의 침전물들을 제거한 후 감압건조하여 증량을 측정하였다. 이를 다시 phosphate

buffered saline(PBS)에 용해시킨 후 0.2 μ m의 무균필터에 통과시켜 냉장보관한 후 각 실험시 적절히 희석하여 사용하였다.

3. 거식세포의 분리

실험 5일전에 생쥐의 복강에 casein(sodium salt, Sigma) 6% 용액을 1ml씩 주사하여 복강내 거식세포를 유발하였고 실험 당일 생쥐를 경추탈골법으로 희생시킨 후 heparin(1 unit/ml)이 첨가된 PBS 용액을 복강에 주입한 후 회수하여 복강내 세포를 획득하였다. 이를 1,500 rpm에서 수회 원심분리하여 세척하고 고착성을 갖는 거식세포를 얻어 10% FBS가 첨가된 IMDM 배지에 부유시킨 후 계수하여 96well microplate의 각 well에 2 x 10⁵ cells/100 μ l 가 되도록 분주하였다.

4. nitric oxide(NO)의 생성 측정

위와 같은 방법으로 분리한 거식세포로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양을 Griess법으로 측정하였다. 거식세포가 부착된 각 well에 0.1, 1 μ g/ml의 lipopolysaccharide(LPS from *E.coli* 0111:B4, Sigma)와 사향의 수용성분(WSF)을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C 완전 습윤된 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양한 후 그 배양액 50 μ l를 96well microplate에 분주하였다. 그 위에 1% sulfanilamide 용액을 50 μ l 첨가한 후 암소에서 5분간 반응시키고 다시 0.1% N-naphthylethylenediamine-2HCl - 2.5% 인산 용액을 50 μ l씩 첨가하여 암소에서 5분간 재반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 거식세포 배양시 WSF 첨가의 대조군으로는 PBS를 사용하였으며 Griess법에 의해 측정된 흡광도는 NaNO₂ 표준곡선(0 - 100 μ M)을 이용하여 정량화하였다.

5. 적혈구 탐식능 측정

거식세포가 sheep red blood cells(SRBC)을 탐식하면 거식세포내에 SRBC hemoglobin이 존재하게 되는데 이 단백질이 갖는 pseudo-peroxidase 활성을 이용하여 탐식된 SRBC의 수를 정량화하였다. 거식세포가 부착된 각 well에 LPS와 사향의 수용성분(WSF)을 첨가하고 37°C 완전 습윤된 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양한 후 배지에 부유시킨 1%의 opsonized SRBC를 첨가하여 1시간동안 배양하였다. 배양후 PBS로 각 well을 수 회 세척하고 증류수로 남은 SRBC를 파괴한 후 다시 PBS로 수 회 세척하였다. 세포 외부의 SRBC를 모두 제거한 well에 0.3% sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma)를 용해시킨 phosphate buffer(pH 5.5) 100 μ l를 30분간 넣어 거식세포와 탐식된 SRBC를 녹인 후, o-tolidine (0.08mg/ml)과 hydrogen peroxide(0.4%)를 첨가한 acetate buffer(pH 5.5) 150 μ l를 넣어 발색시키고 ELISA reader(Molecular devices, USA)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 발색반응의 blank로는 SRBC를 넣지 않은 well들을 사용하였으며 측정된 흡광도는 계수된 SRBC를 계열희석한 well들의 흡광도 표준곡선에 대입하여 정량화하였다.

6. RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 분석

24well plate의 각 well에 2 x 10⁶ 개의 거식세포를 부착시키고 LPS와 사향의 수용성분(WSF)을 처리한 후 4시간후에 RT-PCR법을 수행하였다. 간략히 서술하면 배지를 제거하고 RNAzol(Tel-test, USA)을 거식세포에 처리하여 용해시킨후 chloroform과 isopropanol로 RNA를 추출하였다. MMLV-RTase, random hexamer, dNTP를 첨가하여 역전사반응을 통해 cDNA를 얻은 후 이를 주형으로 하여 actin, TNF- α , Interleukin-10, iNOS 특이적인 sense/antisense primers를 이용하여 PCR 반

응을 수행하였다(Table 1). Extension - denaturation - annealing의 각각의 온도는 72°C - 93°C - 55°C 였으며 전체 25 cycles 반응후 72°C에서 10분간 최종 반응하였다.

7. 세포 생존률(viability) 측정

사향의 수용성분이 거식세포의 생존률에 미치는 영향을 보기 위하여 CellTiter 96 cell proliferation assay kit(Promega, USA)를 사용하여 측정하였다. 거식세포가 부착된 각 well에 LPS와 사향의 수용성분(WSF)을 첨가하고 37°C 완전 습윤된 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양한 후 MTS(tetrazolium inner salt)와 PMS(phenazine methosulfate)를 혼합한 용액을 각 well에 20 μ l 씩 분주한 후 2시간동안 추가로 배양하였다. microplate reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였으며 실험의 blank로는 동량의 배지에 위의 혼합용액을 넣은 well을 사용하였다.

8. TNF- α 생성량 측정

24well plate의 각 well에 2 x 10⁶ 개의 거식세포를 부착시키고 LPS와 사향의 수용성분(WSF)을 처리한 후 4시간후에 배양상층액을 모아 ELISA 측정을 수행하였다(Diaclone, France). 사용방법은 제조사의 사용설명서를 참조하였으며 시약에 포함된 TNF- α 표준품을 계열희석하여 표준정량곡선을 얻어 ELISA 흡광도 값을 이에 대입하여 정량화하였다.

9. 통계 처리법

통계적 유의성을 검정하기 위하여 Student's t-test 방법을 사용하였다.

결 과

1. 거식세포의 nitric oxide(NO) 생성에 미치는 영향

LPS를 24시간 단독 처리한 대조군의 경우 LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 19.6 μM 의 NO를 생성하였으나 WSF 첨가에 의해 7.9 ~ 15.4 μM 로 20 ~ 60% 가량 생성량이 감소하는 것을 볼 수 있었다(Figure 1). 역시 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 24.4 μM 의 NO를 생성하였으나 WSF 첨가에 의해 10.6 ~ 19.7 μM 로 위와 같은 정도로 생성량이 감소하였다. 이와 같은 LPS 활성화시의 NO 생성량 감소는 WSF가 거식세포의 활성화를 억제한다는 증거가 될 수 있다.

2. 거식세포의 탐식능에 미치는 영향

opsonized SRBC에 대한 탐식능은 중요한 거식세포의 활성화 지표가 될 수 있다. 역시 WSF 처리에 의하여 탐식능이 80 ~ 90%까지 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2). NO 생성과 탐식능 실험을 통하여 사향의 수용성분이 복강내 거식세포의 세포적 활성을 상당한 수준으로 억제함을 확인할 수 있었다.

3. 거식세포의 iNOS, TNF- α , IL-10 mRNA 발현에 미치는 영향

위와 같은 WSF에 의한 세포적 활성 감소의 조절 기작을 유추하기 위하여 NO 생성에 관여하는 NOS, 초기 염증반응을 매개하는 TNF- α , 소염반응에 관여하는 IL-10 등의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과 TNF- α 나 IL-10의 경우는 발현량의 차이가 나타나지 않았지만 NO 생성에 직접적으로 관여하는 효소인 NOS의 발현량은 WSF 처리에 의하여 분명하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3). 이 결과는 위 실험에서 NO의 생성량이 감소한 것이 NOS 효소의 mRNA 전사단계에서 조절됨을 규명하였다. 그리고 pro inflammatory cytokine인 TNF- α 의 발현량에는 영향을 주지 않았다는 사실은 WSF에 의한 거식세포 활성화 억제가 특이적인 신호 전달경

로를 거치고 있다는 가능성을 내포하고 있다.

4. 거식세포의 생존률에 미치는 영향

사향의 수용성분에 의한 거식세포 활성화 억제제가 거식세포의 생존률을 감소시키므로써 발생한 비특이적인 현상일 가능성을 확인하기 위하여 MTS 시약을 이용하여 미토콘드리아 효소의 활성을 측정하였다. WSF의 농도에 무관하게 거식세포의 생존률은 대조군과 유사하였으며 이 현상은 LPS 처리유무와도 무관하였다(Figure 4). 따라서 위와 같은 거식세포 활성화 억제는 비특이적인 생존률 감소와는 무관함을 확인하였다.

5. 거식세포의 TNF- α 생성량에 미치는 영향

WSF는 iNOS 발현을 억제함으로써 LPS에 의한 NO 생성을 감소시켰고, 탐식능 또한 저하시키는 것으로 나타났으나 반면에 ELISA로 측정된 세포배양액에서의 TNF- α 단백질의 분비량은 오히려 증가시켰다(Figure 5). 이러한 예는 기존에 알려진 몇몇 천연물 성분에서도 보고된 바 있는데 역시 LPS에 의한 활성화시 WSF가 선택적으로 세포내 전달경로에 관여함을 의미한다고 볼 수 있다. 앞의 RT-PCR 실험에서 WSF에 의한 TNF- α mRNA의 발현량은 변화가 없었음을 고려하면 이러한 분비량 증가는 전사후 조절 단계나 단백질 합성 단계 또는 분비(secretion) 단계에서 조절되고 있을 것이다.

고 찰

사향은 강한 향과 함께 강력한 중추 흥분작용, 강심작용, 남성 호르몬 작용 및 소염작용 등이 있다고 보고되어 왔으며 실제 임상에서도 다양한 처방에 이용되고 있고 의약품 시장에서도 이러한 사향제제의 비중은 상당히 크다고

할 수 있다. 그러나 살아 있는 동물에서 채취 하여야 한다는 문제는 결국 사향노루의 무분별한 포획을 통한 개체수 감소로 이어져 현재는 CITES 협약을 통하여 국제적으로 보호종으로 지정되어 있으며 국가간의 거래도 상당한 제재를 받고 있다. 국내의 경우 주로 우황청심원의 제조에 있어서 사향 대체물질의 연구가 진행되어 왔으며 그에 따라 사향의 주방향 성분인 L-muscone, 역시 동물 유래의 방향 생약인 영묘향, 식물 유래의 방향 생약인 석창포 및 장뇌 등이 사용되고 있다. 이러한 물질들이 사향 대체물질로서 유용한가의 논란이 지속되고 있으나 가장 중요한 것은 비교시 기준이 되는 사향 자체의 성분분석과 생물학적인 활성 그리고 약리적인 기작의 규명이라고 할 수 있다.

그 동안 대부분의 사향 연구는 지용성의 방향 성분과 남성호르몬 성분에 집중되어 중추 흥분 및 강심, β -adrenergic effect 가 보고 되었으나 최근의 연구 결과에 의하면 사향의 수용성 성분에서도 중요한 소염작용이 있음이 밝혀지고 있다. 동물실험의 경우 한천 또는 효모에 의해 유도된 관절 부종이나 파두유에 의해 유도된 귀부위의 염증에서 사향의 수용성분이 생체내 소염제인 hydrocortisone보다 농도대비로 수백 배 강력한 결과를 보였고 염증에 의해 유도된 복강내의 백혈구의 수치를 80% 이상 감소시키는 효과를 보였다고 보고되었다.^{9),10)} 따라서 본 실험에서는 복강내 거식세포의 활성화에 미치는 영향과 기작에 대한 실험을 수행하였고 사향의 수용성분이 거식세포의 활성화 억제제를 통해 소염작용을 나타낼 수 있다는 사실을 규명하였다.

nitric oxide(NO)는 미량으로 존재하는 세포간의 중요한 신호전달물질이지만 거식세포가 활성화되어 탐식작용을 하는 경우 iNOS에 의하여 대량으로 생성되어 외부 침입물질을 파괴하는 강력한 자유기 물질로 작용하여 생체내 방어기작에 중요한 역할을 수행한다. 정상적으로

조절되는 경우는 면역세포의 식균작용, 항암작용 등에 있어 중요한 매개체로 작용하지만 자가면역질환이나 만성적 염증등의 질환에 있어서는 정상세포 및 조직을 파괴하는 요인이 된다. WSF는 iNOS의 mRNA 발현을 억제함으로써 NO 생성을 유의성있게 감소시켰고 거식세포의 탐식능을 상당한 수준까지 억제하였다. WSF는 거식세포의 생존률에는 전혀 영향을 미치지 않았고 이러한 사실로부터 비특이적인 활성억제는 아니라는 사실을 유추할 수 있다. 결국 사향의 수용성분이 동물실험에서 나타낸 소염작용은 상당 부분 이러한 거식세포의 활성억제를 통하여 일어났을 수 있다고 판단된다.

iNOS의 발현 억제에도 불구하고 pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 의 생성량이 다소 증가한 것은 소염작용과 일치하지 않는다고 판단할 수 있으나 실제로 일부 천연물 성분에서는 NO 생성과 TNF- α 의 생성이 일치하지 않는다는 사실들이 보고되어 왔다. 십자화과 식물에서 발견되는 allyl isothiocyanates의 경우 LPS에 의한 NO의 생성은 90% 가량 억제하였으나 TNF- α 의 생성은 대조군보다 50% 가량 증가시켰다고 보고되었다.¹¹⁾ 또한 가장 대표적인 flavonoids의 하나인 quercetin의 경우 RAW 264.7 세포에서 0.1mM의 농도로 실험한 경우 LPS에 의한 iNOS 발현과 NO 분비는 감소시켰지만 TNF- α 분비는 증가시켰다는 결과가 보고되었고 이것은 본실험의 결과와 일치한다.¹²⁾ iNOS의 경쟁적 억제물질인 N^G-monomethyl-L-arginine(NMLA)도 유사한 작용이 보고되었다.¹³⁾ 따라서 사향의 수용성분은 LPS에 의해 유도되는 거식세포의 반응을 선택적으로 활성화 또는 억제한다고 추정할 수 있다. 구체적인 세포내 기작에 대해서는 추후의 연구가 필요하지만 일차적으로는 염증반응에 관련된 전사인자의 조절 양상을 확인해야 할 것이다.

결론

사향의 수용성분은 LPS에 의해 자극된 생쥐 복강 유래의 거식세포에 대해 NO의 생성을 유의성있게 억제하였고 또한 opsonized SRBC에 대한 탐식능을 상당한 수준으로 감소시켰다. mRNA 수준에서의 발현을 조사한 결과 iNOS의 발현 감소가 NO의 생성 억제로 연결되었음을 확인하였고 TNF- α 의 경우에는 발현에는 영향을 받지 않았으나 단백질 수준에서의 생성량은 다소 증가한 것을 확인하였다. 이러한 결과들을 통하여 사향의 수용성분은 거식세포의 활성화 억제를 통하여 소염작용을 나타낼 수 있음을 증명하였다.

참고문헌

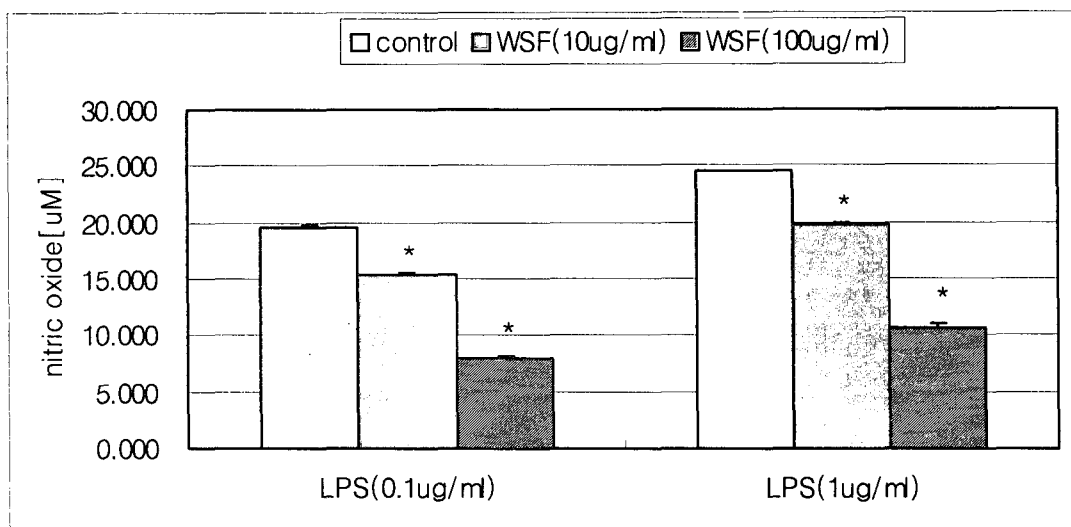
1. 이상인의 15인, 본초학, 영림사, 520-522, 1999
2. Kimura M, Waki I, Inagaki J : Fundamental research on the pharmacological activity of oriental drugs XII. Yakugaku zasshi 98:466-472, 1978
3. Taneja V, Siddiqui H, Arora R : Studies on the anti-inflammatory activity of musk and its possible mode of action. Indian J Physiol Pharmacol 17:241-247, 1973
4. Kimura M, Waki I, Ishida M : Fundamental research on the pharmacological activity of oriental drugs XI. Yakugaku zasshi 98:442-447, 1978
5. Morishita S, Mishima Y, Shoji M : Pharmacological properties of musk. Gen. Pharmac. 18:253-261, 1987
6. Do J, Kitatsuji E, Yoshii E : Study on the components of musk. Chem. Pharm. Bull. 23:629-635, 1975
7. Sokolov V, Kagan M, et al. : Musk deer: Reinvestigation of main lipid components from preputial gland secretion. J. Chem. Ecol. 13:71-83, 1987
8. Yu D, Liu X, Gao S : Studies on the antiinflammatory principle of musk. Acta Pharmac. Sinica 15:306-307, 1980
9. Zhu X, Wang W, Xu G : The pharmacological activities of musk II. Acta Pharmac. Sinica 23:406-410, 1988
10. Zhu X, et al. : The pharmacological activities of musk III. Acta Academiae Medicinae Sinicae 11:52-56, 1989
11. Ippoushi K, et al. : Effect of naturally occurring organosulfur compounds on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. Life Sciences 71:411-419, 2002
12. Wadsworth TL, Koop DR : Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. Biochem. Pharmacol. 57:941-949, 1999
13. Borges MM, Kloetzel JK, et al. : Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF- α production during Trypanosoma cruzi infection. Immunol. Lett. 63:1-8, 1998

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

	oligonucleotide sequence
actin	5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'
TNF- α	5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3' 5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'
iNOS	5'-ACG GGC ATT GCT CCC TTC CGA AGT-3' 5'-ACC GAA GAT ATC TTC ATG ATA ACG-3'
IL-10	5'-ATA ACT GCA CCC ACT TCC CAG-3' 5'-ATC CTC CTT GAT TTC TGG GC-3'

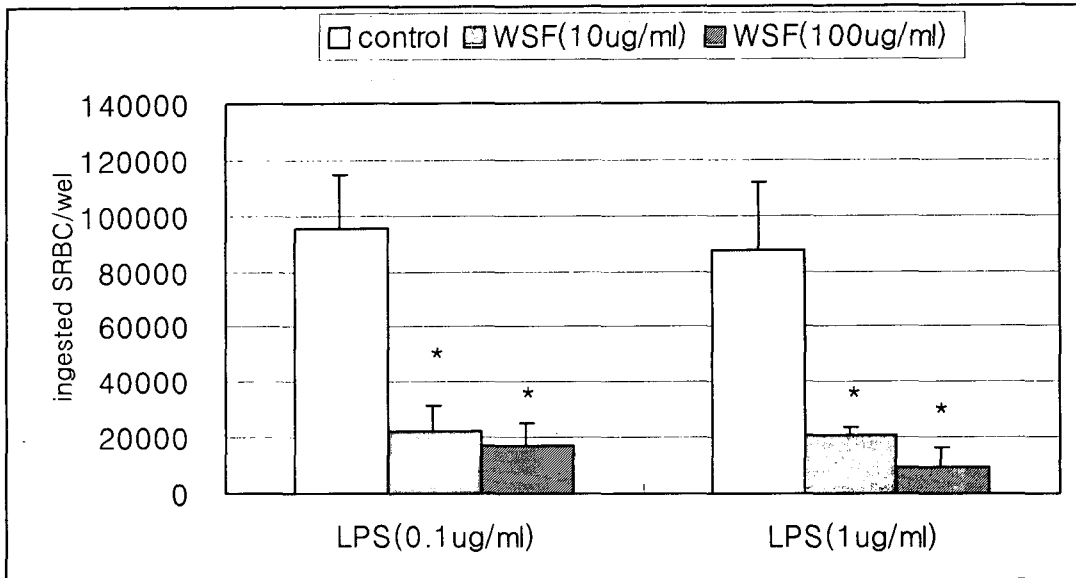
TNF- α (tumor necrosis factor- α)
iNOS (inducible nitric oxide synthase)
IL-10 (interleukin-10)

Figure 1. Effects of WSF on NO production



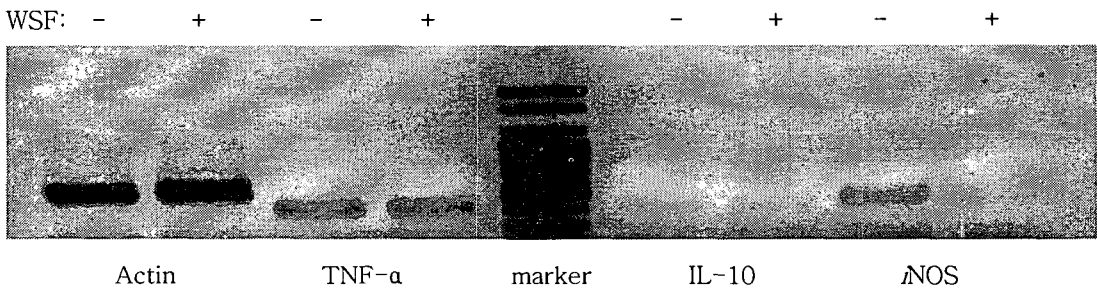
Murine peritoneal macrophages were cultured with WSF in the presence of LPS(0.1 ug/ml, 1 ug/ml) for 24hr. Culture supernatants were collected and assayed with Griess reagent. (*p < 0.01)

Figure 2. Effects of WSF on the phagocytosis of the opsonized SRBC



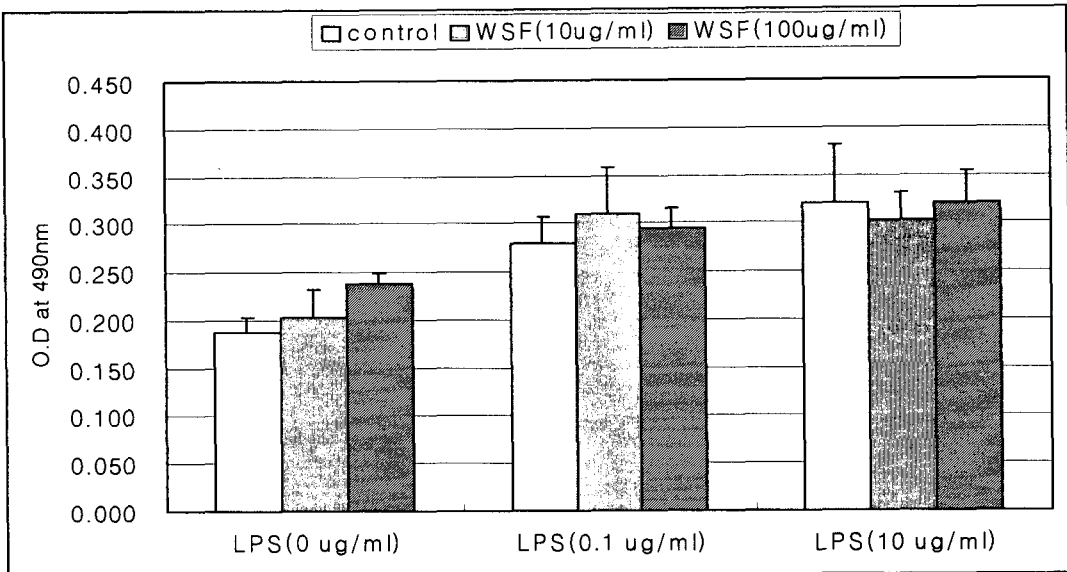
Murine peritoneal macrophages were cultured with WSF in the presence of LPS(0.1 ug/ml, 1 ug/ml) for 24hr and phagocytic activity on the opsonized SRBC were assayed (*p < 0.05)

Figure 3. Effects of WSF on mRNA expression of TNF- α , IL-10 and iNOS



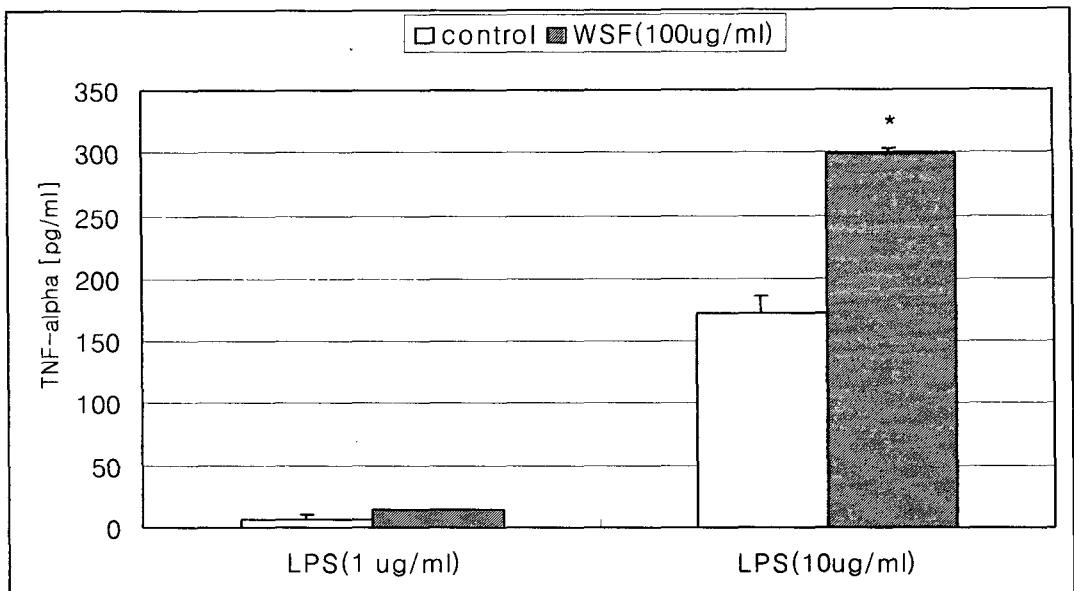
Murine peritoneal macrophages were cultured with or without WSF(100ug/ml) in the presence of LPS(10 ug/ml) for 4hr and RT-PCR assay was performed.

Figure 4. Effects of WSF on the viability of macrophages



Murine peritoneal macrophages were cultured with WSF in the absence or presence of LPS(0.1, 10 ug/ml) for 24hr and viability of cells was checked with MTS reagents. Statistical differences were not observed between control and WSF-treated groups.

Figure 5. Effects of WSF on TNF- α release



Murine peritoneal macrophages were cultured with or without WSF(100ug/ml) in the presence of LPS(1 ug/ml, 10 ug/ml) for 4hr. Culture supernatants were collected and ELISA was performed to detect TNF- α release. (*p < 0.05)